·论著·

胱抑素 A 是预测股骨头坏死的一个潜在生物标志物

田佳庆[1，2]，彭鹏[1，2]，韦雨柔[1，2]，肖方骏[1，2]，何宪顺[1，2]，林锟[1，2]，陆舜[1，2]，何敏聪[2]，刘良燕[3]，魏秋实[2，3，4*]

1.510006 广东省广州市，广州中医药大学
2.510006 广东省广州市，广东省中医骨伤研究院关节中心
3.515400 广东省揭阳市，揭西县中医医院博士工作站骨科
4.510006 广东省广州市，中医证候全国重点实验室 / 骨科，广州中医药大学第三附属医院关节中心
*通讯作者：魏秋实，主任医师 / 博士生导师；Email：weiqshi@126.com

【摘要】 **背景** 股骨头坏死（ONFH）是一种临床难治性骨科疾病，发病率较高，预后差。目前磁共振成像（MRI）是诊断 ONFH 的“金指标”，但其检查流程繁琐，费用较高，无法作为常规筛查的工具。因此，亟待研发新型分子生物标志物用于 ONFH 的诊断。**目的** 研究 ONFH 患者血清胱抑素 A（CSTA）水平，评估其作为 ONFH 生物标志物的诊断价值。**方法** 选取 2023 年 5—11 月于广州中医药大学第三附属医院就诊的 21 例 ONFH 患者为实验组，同期招募 33 例健康志愿者为对照组。收集受试者血清和股骨头组织样本（包括实验组 17 例 ONFH 患者，同期因股骨颈骨折手术的 6 例患者为 FNF 组），采用酶联免疫吸附法（ELISA）检查血清 CSTA 水平；采用苏木精 – 伊红（HE）染色观察骨组织形态，并使用 Micro CT 扫描检测骨微结构；应用 Trap 染色评估不同骨组织中破骨细胞分化能力；通过免疫组化、免疫荧光和 Western Blot 评估骨组织 CSTA 的表达水平；采用 Spearman 秩相关分析 CSTA 水平与国际骨循环研究协会（ARCO）分期之间的相关性；绘制受试者工作特征（ROC）曲线评估 CSTA 诊断价值。**结果** 血清 CSTA 检测结果显示，实验组高于对照组，且随着 ARCO 分期的进展，CSTA 蛋白表达水平也逐渐增高，差异有统计学意义（P<0.05）；HE 染色结果显示 ARCO Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组空骨陷窝率高于 FNF 组，ARCO Ⅳ高于 ARCO Ⅱ期，差异有统计学意义（P<0.05）；MicroCT 定量分析结果显示，ARCO Ⅱ、Ⅲ组骨体积分数（BV/TV）、骨小梁厚度（Tb.Th）、骨梁数量（Tb.N）低于 FNF 组，骨小梁分离度（Tb.Sp）高于 FNF 组（P<0.05）；Trap 染色结果显示：ARCO Ⅱ、Ⅲ组 Trap 阳性细胞区域面积高于 FNF 组，且 ARCO Ⅱ高于 ARCO Ⅳ期，差异均有统计学意义（P<0.05）；骨组织 CSTA 检测结果显示，ARCO Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ期组 CSTA 表达高于 FNF 组，且 ARCO Ⅳ高于 ARCO Ⅱ期，差异均有统计学意义（P<0.05）；血清 CSTA 水平诊断 ONFH 的 ROC 曲线下面积（AUC）为 0.9394（P<0.001），敏感性为 78.79%，特异性为 95.24%。**结论** CSTA 蛋白可通过调控破骨细胞的形成来影响股骨头内坏死骨的修复，在股骨头坏死患者中，CSTA 表达升高与疾病的严重程度呈正相关。

【关键词】 股骨头坏死；CSTA；破骨细胞；生物标志物；ARCO 分期
【中图分类号】 R 68 【文献标识码】 A DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2024.0299

CSTA Is a Potential Biomarker for Anticipating Osteonecrosis of the Femoral Head

TIAN Jiaqing[1，2]，*PENG Peng*[1，2]，*WEI Yurou*[1，2]，*XIAO Fangjun*[1，2]，*HE Xianshun*[1，2]，*LIN Kun*[1，2]；*LU Shun*[1，2]，*HE Mincong*[2]，*LIU Liangyan*[3]，*WEI Qiushi*[2，3，4*]

1.Guangzhou University of Chinese Medicine，Guangzhou 510006，China
2.Joint Center，Guangdong Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine Orthopedics and Traumatology，Guangzhou 510006，China
3.Orthopedics Department，Doctor Workstation，Jiexi County Hospital of Traditional Chinese Medicine，Jieyang 515400，China

基金项目：国家自然科学基金资助项目（82274544，82004392）；广东省基础与应用基础基金资助项目（2023A1515010551）；广东省中医骨伤研究院开放课题重点项目（GYH202101-01，GYH202101-04）

引用本文：田佳庆，彭鹏，韦雨柔，等. 胱抑素 A 是预测股骨头坏死的一个潜在生物标志物［J］. 中国全科医学，2024. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2024.0299.［Epub ahead of print］［www.chinagp.net］

TIAN J Q，PENG P，WEI Y R，et al. CSTA IS a Potential Biomarker for Anticipating Osteonecrosis of the Femoral Head［J］. Chinese General Practice，2024.［Epub ahead of print］

4.Orthopedics Department，State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome/Joint Center，Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine， Guangzhou 510006，China
*Corresponding author：WEI Qiushi，Chief physician/Doctoral supervisor；Email：weiqshi@126.com

【Abstract】 **Background** Osteonecrosis of the femoral head （ONFH） is a clinically refractory orthopedic disease with a relatively high incidence and poor prognosis. Currently，magnetic resonance imaging （MRI） is the "gold standard" for diagnosing ONFH，but its examination process is cumbersome and the cost is high，so it cannot be used as a tool for routine screening. Therefore，it is urgent to develop new molecular biomarkers for the diagnosis of ONFH. **Objective** To study the serum cystatin A （CSTA） level in ONFH patients and evaluate its diagnostic value as a biomarker for ONFH. **Methods** 21 ONFH patients who visited the Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine from May to November 2023 were selected as the experimental group，and 33 healthy volunteers were recruited as the control group at the same time. Serum and femoral head tissue samples were collected from the subjects （including 17 ONFH patients in the experimental group，and 6 patients who underwent femoral neck fracture surgery at the same time were the FNF group）. The serum CSTA level was detected by ELISA；the bone tissue morphology was observed by HE staining，and the bone microstructure was detected by Micro CT；Trap staining was used to evaluate the osteoclast differentiation ability in different bone tissues；the expression level of CSTA in bone tissues was evaluated by IHC，IF and WB；Spearman rank correlation analysis was used to analyze the correlation between CSTA level and ARCO stage；the ROC curve was drawn to evaluate the diagnostic value of CSTA. **Results** The results of serum CSTA detection showed that the level in the experimental group was higher than that in the control group，and with the progress of the ARCO stage，the expression level of CSTA protein also gradually increased，and the difference was statistically significant （P<0.05）；HE staining results showed that the empty lacuna rate in ARCO Ⅱ，Ⅲ，and Ⅳ groups was higher than that in the FNF group，and ARCO Ⅳ was higher than ARCO Ⅱ，and the difference was statistically significant （P<0.05）；Micro CT quantitative analysis results showed that the bone volume fraction （BV/TV），trabecular bone thickness （Tb.Th），and trabecular bone number （Tb.N） in ARCO Ⅱ and Ⅲ groups were lower than those in the FNF group，and the trabecular bone separation （Tb.Sp） was higher than that in the FNF group （P<0.05）；Trap staining results showed that the area of Trap－positive cell regions in ARCO Ⅱ and Ⅲ groups was higher than that in the FNF group，and ARCO Ⅱ was higher than ARCO Ⅳ，and the differences were all statistically significant （P<0.05）；the results of CSTA detection in bone tissues showed that the CSTA expression in ARCO Ⅱ，Ⅲ，and Ⅳ groups was higher than that in the FNF group，and ARCO Ⅳ was higher than ARCO Ⅱ，and the differences were all statistically significant （P<0.05）；the area under the ROC curve （AUC） of serum CSTA level in diagnosing ONFH was 0.9394（P<0.001），with a sensitivity of 78.79% and a specificity of 95.24%. **Conclusion** The CSTA protein can affect the repair of necrotic bone in the femoral head by regulating the formation of osteoclasts. In patients with osteonecrosis of the femoral head，the increased expression of CSTA is positively correlated with the severity of the disease.

【Key words】 Osteonecrosis of the femoral head；CSTA；Osteoclast；Biomarker；ARCO staging

股骨头坏死（osteonecrosis of the femoral head，ONFH）是一种临床常见的骨伤科疾病，其发病率高，预后差，治疗不及时会导致股骨头塌陷，严重影响患者的生活质量[1]。股骨头坏死与多种风险因素有关，包括长时间大量使用糖皮质激素和过度摄入酒精等[2-3]。股骨头坏死早期无症状，当症状出现时，股骨头已经发生了严重的损伤，且随着股骨头破坏的逐渐加重，股骨头塌陷的风险增加[4]。因此，股骨头坏死的早期诊断对于防治至关重要。

胱抑素A（CSTA）是一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂[5]。而CSTA过表达会抑制破骨细胞的形成[6]。前期研究发现，股骨头坏死早期股骨头内破骨细胞活性增强，骨吸收活跃，有助于坏死骨的吸收[7]。因此，通过血清CSTA水平变化预测股骨头坏死的早期发病，对于股骨头坏死早期诊断具有重要意义。CSTA表达水平与股骨头坏死进展程度之间的关系尚不明确。本研究通过比较ONFH患者与健康者血清和骨组织中CSTA水平差异，探究CSTA与股骨头坏死进程之间的关系，旨在为ONFH的早期诊断提供参考依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取2023年5—11月于广州中医药大学第三附属医院诊断为ONFH的33例患者为实验组，同期选取健康志愿者21例为对照组，抽取血清待测；同时，在ONFH患者中收集因全髋关节置换术后股骨头样品17例为实验组，股骨颈骨折患者6例为FNF组。纳入标准：（1）国际骨循环研究协会（ARCO）分期[8-9]至少为ARCO Ⅱ期或更高；（2）受试者年满18岁。排除标准：（1）既往髋部或股骨创伤或手术史；（2）恶性肿瘤、心血管疾病和代谢性骨病（如类风湿关节炎）病史；（3）最近3个月内参加过其他临床试验；

（4）正在服用影响骨代谢的药物。本研究方案经广州中医药大学第三附属医院委员会批准（批准号：PJ-KY-20220420-013），所有参与者均获得知情同意。

ONFH诊断标准：X线片检查，典型表现包括关节软骨下弧形低密度影与硬化区，可能伴有软骨面塌陷，发展到后期股骨头会塌陷变平，进而出现关节炎；CT检查，在ARCO Ⅱ、Ⅲ期时，能够清楚地显示坏死灶的边界、面积、硬化带、病灶的修复状态以及软骨下骨折情况；MRI检查：T1WI带状低信号包绕脂肪（中、高信号）或坏死骨（中信号），T2WI呈现双线征，T2WI抑脂相病灶边缘有高信号带。

ARCO分期标准：ARCO分期标准由国际骨循环研究协会制定并于2019年修订，Ⅰ和Ⅱ期为塌陷前病变，Ⅰ期X线片正常但磁共振成像阳性，Ⅱ期X线片有异常但无软骨下骨折等表现；Ⅲ期X-ray或CT显示软骨下或坏死区骨折、塌陷，Ⅲ A期股骨头塌陷≤ 2 mm为早期，Ⅲ B期股骨头塌陷 >2 mm为晚期；Ⅳ期X线表现为骨关节炎，有关节间隙变窄、髋臼改变和/或关节破坏。

健康志愿者标准：参考世界卫生组织（WHO）关于“健康”的概念，并排除既往明确有其他疾病者。

1.2 研究方法

1.2.1 样品采集 清晨空腹状态下采集受试者外周静脉血5 ml，室温放置2 h后，4 ℃，1000 g离心10 min，分离血清，储存在 -80 ℃冰箱待测。实验组股骨头样本取自患者股骨头坏死区域（17例），其中Ⅲ期5例，Ⅱ期和Ⅳ期各6例；FNF组采集同期因股骨颈骨折手术患者的股骨头样本（6例）。

1.2.2 X-ray检测 患者站于X射线机前方将患侧髋关节置于感应器中心，医生依患者情况拍摄髋关节正位片。

1.2.3 酶联免疫吸附法（ELISA）检测血清CSTA水平 采用ELISA检测试剂盒（上海艾比玛特医药科技有限公司，货号：AB-3826）检测血清CSTA水平，操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.2.4 HE染色检测骨组织形态 采集新鲜的股骨头标本，4%多聚甲醛溶液固定48 h，10 %乙二胺四乙酸（EDTA）溶液中脱钙6周后，样品进行乙醇梯度脱水（75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、无水乙醇2次，各3 min），石蜡包埋，制作5 μm切片。用二甲苯脱蜡2次，每次8 min，乙醇梯度复水（无水乙醇2次各3 min，95%乙醇3 min，85%乙醇3 min，75%乙醇3 min），在PBS内复水后，用苏木素染色液染色2 min、伊红染色液浸染30 s，脱水封片。采用BX53奥林巴斯显微镜观察和分析骨组织形态。

1.2.5 免疫组化检测骨组织CSTA水平 将骨组织石蜡切片脱蜡、水化，柠檬酸钠抗原修复液热修复3次，3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶。将CSTA抗体（1∶200）滴加到切片上并置于4° C冰箱过夜孵育后，冲洗后加二抗（生物素标记山羊抗兔IgG，1∶200）室温孵育2 h，用3，3′ -二氨基联苯胺（DAB）染色液和苏木素溶液染色，梯度乙醇脱水后用中性树胶密封，BX53奥林巴斯显微镜下观察，评估CSTA的表达水平。

1.2.6 免疫荧光检测骨组织CSTA水平 骨组织石蜡切片脱蜡、水化、热修复后，用0.1% Triton溶液浸泡，冲洗，室温封闭2 h。用CSTA抗体（1∶200）置于4 ℃孵育过夜。冲洗后加异硫氰酸荧光素标记二抗（FITC-山羊抗兔IgG，1∶200）室温孵育1 h后，用含4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）的防荧光猝灭剂封片。使用FluoViewTM FV1000奥林巴斯荧光显微镜观察拍照，利用Image J 1.54软件对免疫荧光阳性区域进行分析，计算阳性区域面积。

1.2.7 Trap染色检测破骨细胞活性 骨组织石蜡切片脱蜡、水化后，用Trap染色试剂盒（塞维尔生物，货号：G1050）对石蜡切片进行染色，中性树胶封片后置于显微镜下观察Trap阳性细胞染色情况。利用Image J 1.54软件对免疫荧光阳性区域进行勾选，计算阳性区域面积。

1.2.8 Western Blot检测骨组织CSTA表达水平 每组取适量骨组织样本，加入裂解液，将样品进行超声波粉碎并在冰上裂解15 min，12000 g离心15 min后，取上清，按照BCA蛋白测定试剂盒（碧云天生物技术，货号：P0398S）说明书测定蛋白浓度。上清液用10%SDS-PAGE凝胶电泳分离后，电转移到PVDF膜上，摇床中轻摇1 h，分别加入CSTA抗体（1∶1000），置于4 ℃过夜后，用二抗（生物素标记山羊抗兔IgG，1∶10000）室温下孵育90 min，滴入BCL显影剂，观察蛋白表达情况，通过Image J软件对蛋白表达情况进行定量分析。

1.2.9 Micro CT检测骨小梁变化 使用平生医疗科技有限公司Micro CT（NMC-200，中国）对17例患者的股骨头样本进行分析。在90 kVpX下进行显微CT扫描和图像重建。随机选取股骨头内感兴趣区域（Region of Interest，ROI），借助Avator 1.24分析软件评估股骨头样品的微观结构，测量骨体积分数（BV/TV）、骨小梁厚度（Tb.Th）、骨小梁分离度（Tb.Sp）、骨梁数量（Tb.N）参数变化。

1.3 统计学方法

采用SPSS 23.0软件进行统计学分析。计量资料使用K-S检验检测是否符合正态分布，符合正态分布的计量资料用（$\bar{x} \pm s$）表示，两组间比较采用t检验，多组间统计使用单因素方差分析；不符合正态分布的计量资料以M（P_{25}，P_{75}）表示，两组间比较采用Wilcoxon符号秩和检验；相关性分析采用Spearman秩相关分析。采用受试者工作特征（ROC）曲线评估CSTA诊断效能。

以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

该研究血清样本采集共 54 例，对照组 21 例，其中男性 11 例（52.38%），女性 10 例（47.62%），平均年龄 40.2 ± 15.7 岁；实验组 33 例，其中男性 19 例（57.58%），女性 14 例（42.42%），平均年龄 38.2 ± 12.7 岁。两组性别和年龄差异均无统计学意义（$P>0.05$）。骨组织样本采集共 23 例，FNF 组 6 例，其中男性 3 例（50.00%），女性 3 例（50.00%），患者平均年龄 35.1 ± 10.3；实验组 17 例，其中男性 9 例（52.94%），女性 8 例（47.06%），平均年龄 38.51 ± 9.31，两组性别和年龄差异均无统计学意义（$P>0.05$）。

2.2 血清 CSTA 水平

对照组血清 CSTA 水平低于实验组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。ARCO Ⅱ患者血清 CSTA 表达水平低于 ARCO Ⅲ患者，ARCO Ⅲ 患者血清 CSTA 表达水平低于 ARCO Ⅳ，差异均具有统计学意义（$P<0.05$），见表 1。

表 1 血清 CSTA 水平比较

Table 1 Comparison of CSTA levels in serum

组别	例数	CSTA 水平（pg/mL）
对照组	21	12.47 ± 5.38
实验组	33	27.02 ± 7.53[a]
ARCO Ⅱ组	10	19.96 ± 6.43[a]
ARCO Ⅲ组	13	27.26 ± 4.21[ab]
ARCO Ⅳ组	10	33.76 ± 5.55[abc]
F 值		233.374
P 值		<0.001

注：[a] 表示与对照组相比，$P<0.05$；[b] 表示与 ARCO Ⅱ组相比，$P<0.05$；[c] 表示与 ARCO Ⅲ组相比，$P<0.05$；CSTA= 胱抑素 A，ARCO= 国际骨循环研究协会。

2.3 骨组织病理染色及影像学改变

X-ray 结果显示对照组股骨头形态规则，呈球形，关节间隙正常；ARCO Ⅱ期股骨头内硬化、局部骨质疏松、关节间隙正常；实验组 ARCO Ⅲ期股骨头关节面扁平；ARCO Ⅳ期股骨头坏死，股骨头严重塌陷，关节间隙狭窄、髋臼改变，见图 1A–D。FNF 组股骨头内无任何病理损伤；实验组 ARCO Ⅱ期股骨头软骨表面粗糙，骨小梁紊乱，软骨下局部硬化；ARCO Ⅲ期和 ARCO Ⅳ期股骨头明显塌陷，软骨结构严重破坏，明显剥离且 ARCO Ⅳ期股骨头原有形状丧失，见图 1E–H；HE 染色结果显示 FNF 组股骨头内骨小梁结构完整，其内嵌入大量骨细胞，实验组 ARCO Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ空骨陷窝率高于 FNF 组，ARCO Ⅳ高于 ARCO Ⅱ期，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；ARCO Ⅱ与 ARCO Ⅲ期，差异无统计学意义（$P>0.05$），见图 1I–L，表 2。

2.3 Micro CT

Micro CT 扫描结果显示：随着 ARCO 分期的进展，股骨头结构逐渐破坏，在横截面股骨头内观察到大量空腔；股骨头内骨小梁明显下降，特别是在软骨下区域，ARCO Ⅲ期和 ARCO Ⅳ期股骨头内软骨存在明显分离，ARCO Ⅳ期股骨头内出现明显硬化，如图 2 所示。定量分析结果显示，ARCO Ⅱ、Ⅲ组 Tb.N、BV/TV 和 Tb.Th 低于 FNF 组，Tb.Sp 高于 FNF 组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；与 ARCO Ⅱ期相比，ARCO Ⅳ期间 Tb.N、BV/TV、Tb.Th 和 Tb.Sp 均无统计学意义（$P>0.05$），见表 2。

2.4 Trap 染色

Trap 染色结果显示，在 ONFH 组中发现 Trap 阳性细胞，空白组未见 Trap 阳性细胞。定量分析结果显示，ARCO Ⅱ、Ⅲ组 Trap 阳性细胞区域面积高于 FNF 组，ARCO Ⅱ高于 ARCO Ⅳ期，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；ARCO Ⅳ期与 FNF 组，差异无统计学意义（$P>0.05$）见图 3，表 3。

2.5 免疫组织化学染色

免疫组织化学染色结果显示，空白组股骨头内 CSTA 的表达较少。ARCO Ⅱ组，ARCO Ⅲ组和 ARCO Ⅳ组内 CSTA 呈阳性表达，定量分析结果显示，ARCO

表 2 空骨陷窝率和骨小梁参数定量分析比较

Table 2 The quantitative analysis comparison of empty lacunae rate and trabecular bone parameters.

组别	例数	空骨陷窝率（%）	骨小梁参数（$\bar{x} \pm s$）			
			BV/TV	Tb.N	Tb.Sp	Tb.Th
FNF 组	6	5.36 ± 1.77	71.21 ± 2.34	1.71 ± 0.03	0.48 ± 0.05	0.43 ± 0.04
ARCO Ⅱ组	6	25.38 ± 2.78[a]	41.53 ± 2.42[a]	1.04 ± 0.14[a]	0.71 ± 0.03[a]	0.38 ± 0.02[a]
ARCO Ⅲ组	5	76.26 ± 3.35[ab]	25.05 ± 2.54[ab]	0.87 ± 0.03[a]	1.11 ± 0.07[ab]	0.24 ± 0.03[ab]
ARCO Ⅳ组	6	85.40 ± 4.45[ab]	43.54 ± 2.53[a]	1.34 ± 0.13	0.60 ± 0.03[ac]	0.38 ± 0.04
F 值		705.318	302.842	68.964	178.943	36.294
P 值		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

注：空骨陷窝率 = 空骨陷窝数 / 总骨陷窝数；[a] 表示与 FNF 组相比，[b] 表示与 ARCO Ⅱ相比，[c] 表示与 ARCO Ⅲ期相比，$P<0.05$；BV/TV= 骨体积分数，Tb.N= 骨小梁数量，Tb.Sp= 骨小梁分离度，Tb.Th= 骨小梁厚度。

FNF 组 ARCO Ⅱ期 ARCO Ⅲ期 ARCO Ⅳ期

注：ARCO= 国际骨循环研究协会，FNF= 股骨颈骨折；A-D 为 X-ray 影像图，E-H 为大体标本外观图，I-L 为 HE 染色图，黑色箭头所指为空骨陷窝。

图 1 骨组织 HE 染色和影像学比较
Figure 1 Comparison of HE staining and imaging in bone tissue

Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ期组 CSTA 蛋白表达阳性区域面积高于 FNF 组，ARCO Ⅳ高于 ARCO Ⅱ期，差异均有统计学意义（P<0.05）见图 4，表 3。

2.6 免疫荧光染色

免疫荧光染色结果显示，FNF 组骨组织 CSTA 的表达较少。ARCO Ⅱ组，ARCO Ⅲ组和 ARCO Ⅳ组内 CSTA 呈阳性表达（绿色荧光），定量分析结果显示，ARCO Ⅲ和Ⅳ期组 CSTA 蛋白表达阳性区域面积高于 FNF 组，ARCO Ⅳ高于 ARCO Ⅱ期，差异均有统计学意义（P<0.05），ARCO Ⅱ期 CSTA 蛋白表达阳性区域与 FNF 组相比，差异无统计学意义（P>0.05）见图 5，表 3。

2.7 Western blot

Western blot 结果显示：ARCO Ⅲ和Ⅳ期组 CSTA 表达高于 FNF 组，ARCO Ⅳ高于 ARCO Ⅱ期，差异均有统计学意义（P<0.05），ARCO Ⅱ期 CSTA 表达与 FNF 组相比，差异无统计学意义（P>0.05），见图 6，表 3。

2.8 血清 CSTA 水平诊断 ONFH 的 ROC 曲线

绘制血清 CSTA 水平诊断 ONFH 的 ROC 曲线，结果显示血清 CSTA 水平诊断 ONFH 的 AUC 值为 0.939（P<0.001），敏感性为 78.79%，特异性为 95.24%，截断值为 20.85 pg/mL，见图 7。

3 讨论

股骨头坏死的防治是骨科领域的难题之一，因其早期诊断困难，发现时，股骨头已存在塌陷[10]。塌陷引起的疼痛和功能活动障碍严重影响了患者的生活质量和工作能力，部分患者甚至丧失活动能力，不得不接受人工髋关节置换术，而股骨头坏死常常好发于中青年人群，假体的使用寿命又是影响 ONFH 治疗的主要原因。目前 MRI 是 ONFH 早期诊断的“金指标”[11]，但由于费用较高，流程繁琐，无法作为疾病筛查的手段。因此，如何早期监测股骨头坏死的发病，对于其防治至关重要。

因此，笔者从血清检测和病理学检测角度入手，探究股骨头坏死早期的生物标志物。

目前认为股骨头坏死的主要原因是股骨头内血流灌注不足，引起股骨头内骨细胞凋亡，股骨头力学承载能力下降导致股骨头塌陷的发生[12-14]。本文通过对不同ARCO分期下股骨头标本进行HE染色，Micro CT扫描后发现，随着ONFH的发展，坏死区域的骨细胞凋亡数量增加，且骨小梁微观结构变化显著。但是股骨头内部结构的变化并不会在股骨头坏死早期出现。因此，通过临床影像学手段对股骨头检查以进行早期诊断略显不足。在凋亡发生时，蛋白水平会发生相应变化，当骨细胞出现凋亡时，股骨头内成骨-破骨能力出现变化。既往研究发现，在ONFH发病早期，患者血清和股骨头坏死区核因子κB受体活化因子配体（RANKL）表达水

FNF组　ARCO Ⅱ期　ARCO Ⅲ期　ARCO Ⅳ期

A B C D

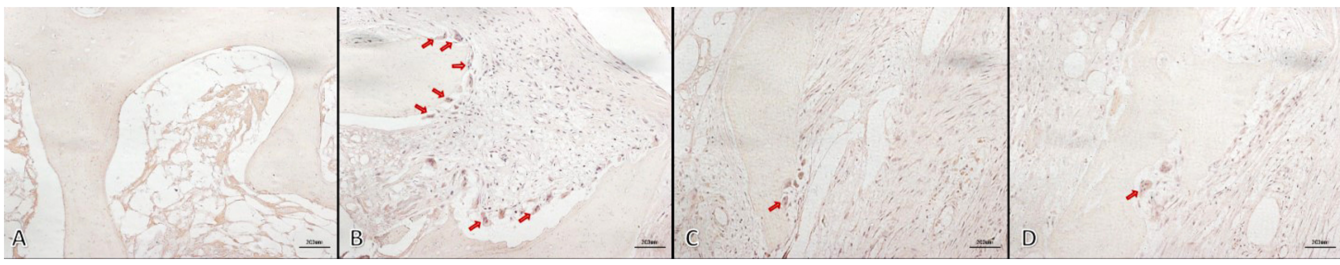
E F G H

I J K L

注：A-D为股骨头大体标本直观图；E-H为Micro CT扫描图；I-L为Micro CT重建图

图2　Micro CT扫描图像分析

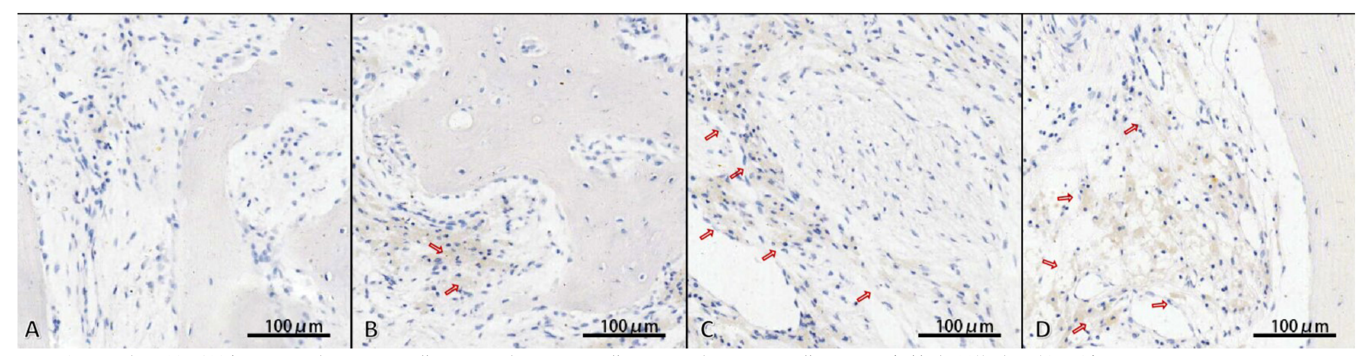
Figure 2　Micro CT scan image analysis



注：A为FNF组；B为ARCO Ⅱ期组；C为ARCO Ⅲ期组；D为ARCO Ⅳ期组；红色箭头所指为Trap染色阳性区域。

图3　骨组织Trap染色

Figure 3　TRAP staining results of osteonecrosis



注：A 为股骨颈骨折组；B 为 ARCO Ⅱ期组；C 为 ARCO Ⅲ期组；D 为 ARCO Ⅳ期组，红色箭头所指为阳性区域

图 4 免疫组织化学检测骨组织 CSTA 表达

Figure 4 Immunohistochemical of CSTA expression in femoral head tissue

表 3 Trap 染色和骨组织 CSTA 表达定量分析

Table 3 The results of quantitative analysis of trap staining and CSTA expression in osseous tissue

组别	例数	Trap 染色结果	CSTA		
			免疫组织化学	免疫荧光染色	Western blot
FNF 组	6	0.18 ± 0.04	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.36 ± 0.02
ARCO Ⅱ组	6	1.00 ± 0.10[a]	0.40 ± 0.15	0.20 ± 0.06	0.37 ± 0.01
ARCO Ⅲ组	5	0.60 ± 0.10[a]	0.67 ± 0.15[ab]	0.65 ± 0.17[ab]	0.67 ± 0.05[ab]
ARCO Ⅳ组	6	0.32 ± 0.05	1.00 ± 0.36[abc]	1.00 ± 0.24[abc]	1.00 ± 0.03[abc]
F 值		52.394	33.348	50.027	324.013
P 值		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

注：[a] 表示与 FNF 组相比 $P<0.05$，[b] 表示与 ARCO Ⅱ相比 $P<0.05$，[c] 表示与 ARCO Ⅲ期相比 $P<0.05$；ELISA= 酶联免疫吸附测定，Western blot= 蛋白质印迹，Trap= 抗酒石酸酸性磷酸酶。

平均有所升高，此时破骨细胞能力增强，有利于股骨头内坏死骨的吸收[7]。这一发现与本研究 TRAP 染色结果相同，在股骨头坏死早期，破骨细胞分化能力增强，随着股骨头坏死的逐步进展，破骨能力减弱。因此，成骨细胞和破骨细胞能力的评价指标可作为 ONFH 早期诊断的重要标志。

既往研究证实，半胱氨酸蛋白酶家族的某些成员具有调节成骨细胞和破骨细胞的能力[15]。CSTA 是半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族的一部分，且 CSTA 变化与绝经后骨质疏松症之间存在密切联系[16]。该蛋白主要表达于骨小梁表面的成骨细胞中，通过成骨细胞分泌，影响破骨细胞的发育[17]。CSTA 可以抑制蛋白激酶 B（AKT）的磷酸化[18]。AKT 是磷脂酰肌醇 -3 激酶（PI3K）信号通路中的关键靶点，在细胞外信号激活后，PI3K 引起磷脂酰肌醇 3- 激酶（PIP3）的激活，使其与 AKT 的 PH 区结合，激活 AKT，从而调控一系列生物行为，包括细胞生长、增殖、自噬和迁移[19-20]。AKT 是骨重塑的中枢调节因子，抑制 PI3K/AKT 信号通路活性导致破骨细胞介导的骨吸收减少[21]。PI3K/AKT 信号通路已被确定为激活 RANKL/RANK（核因子 κB 受体激活蛋白）的重要途径之一[22]。降低 PI3K/AKT 磷酸化水平可下调破骨细胞前体分化相关的蛋白的表达，从而抑制 RANKL 诱导的破骨细胞分化[23]。因此，破骨细胞形成的具体机制可能与 CSTA 介导的 AKT 磷酸化有关。本研究通过对不同分期内的股骨头坏死患者血清 CSTA 和股骨头内 CSTA 蛋白表达水平进行研究发现，与健康志愿者相比，ONFH 患者 CSTA 蛋白表达水平明显升高，且随着股骨头坏死的逐步进展，CSTA 表达水平逐渐增高。由此可见，在 ONFH 发生的同时，坏死区域也在进行修复，坏死区域坏死骨的有效吸收和新生血管的形成是新骨发育的先决条件。坏死早期骨吸收过度活跃，坏死骨被迅速吸收。当大部分坏死骨被吸收后，成骨细胞通过分泌 CSTA 蛋白，抑制 AKT 磷酸化来调节破骨细胞形成，防止股骨头结构进一步破坏，并为成骨修复提供稳定的机械环境。

本研究也有一定局限性。（1）本研究样本量过少，可能会引起 ROC 曲线中截断值浓度的偏差，后期拟扩大样本量进一步探究 CSTA 与 ONFH 之间的关系。（2）CSTA 抑制破骨细胞分化的确切机制仍需进一步研究。（3）本研究因伦理问题，未涉及 I 期 ONFH 患者股骨头样品，采取股骨颈骨折术后样品作为对照，可能与 I 期样品存在差异，但本研究也是首次探究 CSTA 与 ONFH 之间的关系。

综上所述，CSTA 的表达水平与 ONFH 发病进程存在密切关系，成骨细胞通过分泌 CSTA 来控制破骨细胞的形成，在促进坏死骨有效吸收的同时，防止骨吸收过程中股骨头的机械承载能力受到过度损害。CSTA 可以作为衡量 ONFH 进展的潜在生物标志物。

作者贡献：田佳庆提出主要研究目标，负责研究的构思与设计，研究的实施，撰写论文；彭鹏，韦雨柔，肖方骏，何宪顺进行数据的收集与整理，统计学处理，图、表的绘制与展示；林锟，陆舜负责临床标本的收集与整理；何敏聪，刘良燕，魏秋实进行论文的修订；魏秋实负责文章的质量控制与审查，对文章整体负责，监督管理。

DAPI FITC Merge

注：DAPI=4′，6- 二脒基 -2- 苯基吲哚，FITC= 异硫氰酸荧光素，Merge=FITC 和 DAPI 合并结果；A 为 FNF 组，B 为 ARCO Ⅱ期组，C 为 ARCO Ⅲ期组，D 为 ARCO Ⅳ期组；蓝色荧光代表 DAPI 染色，绿色荧光代表 CSTA 蛋白 FITC 染色

图 5 免疫荧光检测骨组织 CSTA 的表达

Figure 5 Immunofluorescence of CSTA expression in osseous tissue

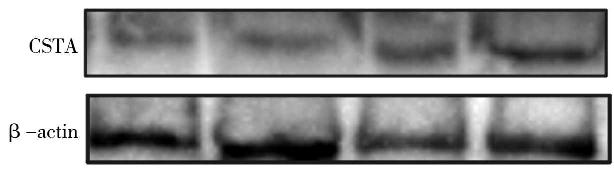
本文无利益冲突。

参考文献

[1] 李志刚，胡海，王春龙，等. 三七活骨丸联合体外冲击波治疗老年早期股骨头缺血性坏死的临床价值[J]. 中国老年学杂志，2024，44（21）：5201-5205.

[2] Microsurgery Department of the Orthopedics Branch of the Chinese Medical Doctor Association；Group from the Osteonecrosis and Bone Defect Branch of the Chinese Association of Reparative and Reconstructive Surgery；Microsurgery and Reconstructive Surgery Group of the Orthopedics Branch of the Chinese Medical Association. Chinese guideline for the diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults[J]. Orthop Surg，2017，9（1）：3-12. DOI：10.1111/os.12302.

[3] CHAI J L，LU B W，DU H T，et al. Pyroptosis-related potential



注：β-actin=β-肌动蛋白。

图 6 Western blot 检测骨组织 CSTA 表达

Figure 6 Western Blot of CSTA expression in osseous tissue

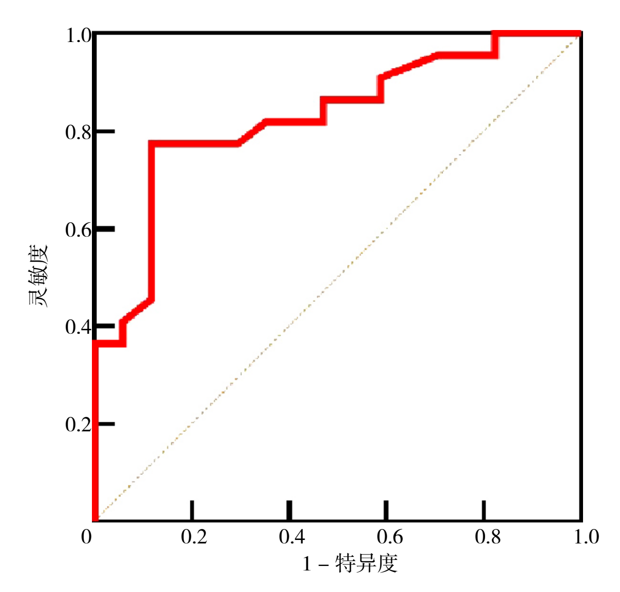


图 7 血清 CSTA 水平诊断 ONFH 的 ROC 曲线

Figure 7 The ROC curve of CSTA levels in serum for the diagnosis of ONFH patients

diagnostic biomarkers in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head［J］. BMC Musculoskelet Disord，2023，24（1）：609. DOI：10.1186/s12891-023-06729-8.

［4］SHAMSI A，BANO B. Journey of cystatins from being mere thiol protease inhibitors to at heart of many pathological conditions［J］. Int J Biol Macromol，2017，102：674-693. DOI：10.1016/j.ijbiomac.2017.04.071.

［5］杨云博，王钰璞，李行，等. 半胱氨酸酶抑制剂 A 在口腔鳞癌中的表达及临床意义［J］. 中国口腔颌面外科杂志，2021，19（6）：494-499. DOI：10.19438/j.cjoms.2021.06.003.

［6］李岳骏. 成骨细胞源性 cystatin A 在骨质疏松发病中的作用与机制研究［D］. 广州：南方医科大学，2019. DOI：10.27003/d.cnki.gojyu.2019.000620.

［7］HE M C，ZHANG J，CHEN X J，et al. Osteoclastic activity was associated with the development of steroid-induced osteonecrosis of femoral head［J］. Artif Cells Nanomed Biotechnol，2020，48（1）：1036-1046. DOI：10.1080/21691401.2020.1774596.

［8］HINES J T，JO W L，CUI Q J，et al. Osteonecrosis of the femoral head：an updated review of ARCO on pathogenesis，staging and treatment［J］. J Korean Med Sci，2021，36（24）：e177. DOI：10.3346/jkms.2021.36.e177.

［9］中国中医药研究促进会中医骨伤临床循证医学分会. 非创伤性股骨头坏死中西医结合诊疗专家共识［J］. 中医正骨，2024，36（9）：1-11. DOI：10.3969/j.issn.1001-6015.2024.09.001.

［10］田佳庆，何敏聪，韦雨柔，等. 激素性股骨头坏死囊性变分布规律及病理特点［J］. 中国组织工程研究，2023，27（31）：4996-5001.

［11］周玉刚，魏歆，李舜. CT 联合 MRI 对股骨头坏死的诊断价值探究［J］. 中国实用医药，2024，19（17）：81-83. DOI：10.14163/j.cnki.11-5547/r.2024.17.020.

［12］杨晓强，肖欢，田佳庆，等. 活血通络胶囊对激素性股骨头坏死囊性变成血管修复的影响［J］. 中医正骨，2024，36（9）：40-48. DOI：10.3969/j.issn.1001-6015.2024.09.007.

［13］田佳庆，刘良燕，彭鹏，等. 基于“成骨－成血管”理论探讨全身振动疗法治疗激素性股骨头坏死的效果及作用机制［J］. 中医正骨，2024，36（9）：59-68，82. DOI：10.3969/j.issn.1001-6015.2024.09.009.

［14］魏秋实. 股骨头坏死态靶辨治体系的构建［J］. 中医正骨，2024，36（9）：15-18. DOI：10.3969/j.issn.1001-6015.2024.09.003.

［15］LIANG W Q，CHEN Q J，CHENG S S，et al. Skin chronological aging drives age-related bone loss via secretion of cystatin-A［J］. Nat Aging，2022，2（10）：906-922. DOI：10.1038/s43587-022-00285-x.

［16］MA M，CHEN X F，LU L Y，et al. Identification of crucial genes related to postmenopausal osteoporosis using gene expression profiling［J］. Aging Clin Exp Res，2016，28（6）：1067-1074. DOI：10.1007/s40520-015-0509-y.

［17］Li Y. Osteoblastic cystatin A regulates bone formation and bone resorption in postmenopausal osteoporosis［D］. Southern Medical University，2019.

［18］LIU Z J，ZHENG L S，LI C Z，et al. Correlated with better prognosis，CSTA inhibits metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via suppressing AKT signaling through promoting METTL3 degradation［J］. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis，2023，1869（5）：166696. DOI：10.1016/j.bbadis.2023.166696.

［19］Gao Y，Zhang M，Zhang R，et al. Whole Grain Brown Rice Extrudate Ameliorates the Symptoms of Diabetes by Activating the IRS1/PI3K/AKT Insulin Pathway in db/db Mice［J］. J Agric Food Chem. 2019，67（42）：11657-11664.

［20］Alzahrani A S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer：At the bench and bedside［J］. Semin Cancer Biol. 2019，59：125-132.

［21］区作明，梁伟春，李兰. 养血固肾汤通过刺激骨髓间质干细胞对破骨细胞形成的调控及对 IGF1R-PI3K-AKT 信号通路的作用［J］. 中国老年学杂志，2023，43（9）：2244-2247. DOI：10.3969/j.issn.1005-9202.2023.09.051.

［22］XIAO D L，ZHOU Q，GAO Y B，et al. PDK1 is important lipid kinase for RANKL-induced osteoclast formation and function via the regulation of the Akt-GSK3β-NFATc1 signaling cascade［J］. J Cell Biochem，2020，121（11）：4542-4557. DOI：10.1002/jcb.29677.

［23］LU J W，KUANG Z H，CHEN T，et al. Isoalantolactone inhibits RANKL-induced osteoclast formation via multiple signaling pathways［J］. Int Immunopharmacol，2020，84：106550. DOI：10.1016/j.intimp.2020.106550.

（收稿日期：2024-07-15；修回日期：2024-08-03）

（本文编辑：李卫霞）